

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 06-128168
(43)Date of publication of application : 10.05.1994

(51)Int.Cl. A61K 35/78
A61K 35/78
A61K 35/78
// C07D311/62

(21)Application number : 04-319196 (71)Applicant : SUETSUNA YOKO
(22)Date of filing : 14.10.1992 (72)Inventor : SUETSUNA KUNIO

(54) TEA CATECHIN COMPOUNDS HAVING ANTIMUTAGENIC ACTIVITY AND SUPEROXIDE DISMUTAGE-LIKE ACTIVITY

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide an anti-mutagenic agent and the superoxide dismutage-like active food material containing as active ingredients tea catechin compounds obtained by extracting tea leave with water, an alcohol or their mixture as an extraction solvent.

CONSTITUTION: The anti-mutagenic agent and the superoxide dismutage-like active food material contains as active ingredients tea catechin compounds, preferably epicatechin gallate [(-)EGGg], epicatechin gallate [(-)ECg] and epigallocatechin [(-)EGC], which are extremely strong in the anti-mutagenic activity against mutagenic agents Trp-P-1 and IQ, and in the active oxygen free radical-eliminating action, namely the superoxide dismutage(SOD)-like activity, are extremely low in toxicity, are safe for human bodies, and are produced by extracting tea leave with water, an alcohol or their mixture as extraction solvents.

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-128168

(43)公開日 平成6年(1994)5月10日

(51)Int.Cl.⁵
A 6 1 K 35/78
// C 0 7 D 311/62

識別記号
A E D C 7167-4C
A B A 7167-4C
A D S 7167-4C
7252-4C

F I

技術表示箇所

審査請求 有 請求項の数2(全7頁)

(21)出願番号

特願平4-319196

(22)出願日

平成4年(1992)10月14日

特許法第30条第1項適用申請有り 平成4年5月9日
日本栄養・食糧学会開催の「平成4年度第46回日本栄
養・食糧学会総会」において文書をもって発表

(71)出願人 591167119

末綱 陽子

山口県下関市川中本町16-14

(72)発明者 末綱 邦男

山口県下関市川中本町16-14

(54)【発明の名称】 抗変異原活性並びにスーパーオキシドジムスターーゼ様活性を有する茶カテキン類

(57)【要約】

【目的】 茶葉を水、アルコール又はこれらの混合溶液を抽出溶媒として抽出した茶カテキン類を有効成分とする抗変異原剤並びにスーパーオキシドジムスターーゼ活性性食材を提供する。

【構成】 茶葉を水、アルコール又はこれらの混合溶液を抽出溶媒として抽出した茶カテキン類の中で、エピガロカテキンガレート ((-) EGCg)、エピカテキンガレート ((-) ECg) 及びエピガロカテキン ((-) EGC) は、変異原剤 Trp-P-1 並びに IQ に対する抗変異原活性は極めて強く、又活性酸素フリーラジカル消去作用すなわちスーパーオキシドジムスターーゼ (SOD) 様活性も極めて強く、毒性も極めて低く生体に安全である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 茶葉を水、アルコール又はこれらの混合溶液を抽出溶媒として抽出した茶カテキン類を含有せしめてなる抗変異原剤

【請求項2】 茶葉を水、アルコール又はこれらの混合溶液を抽出した茶カテキン類を含有せしめてなるスーパー-オキシドジムスター-ゼ様活性食材

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、茶葉の水又はアルコール抽出で得られる茶カテキン類を有効成分とする抗変異原剤並びにスーパー-オキシドジムスター-ゼ様活性食材

【0002】

【従来の技術】 疫学調査によると、ヒトの発癌因子は、食物とタバコであり、この二つが環境中の発癌因子の約70%を占めているといわれる。突然変異の抑制には、変異原物質が直接、物理的あるいは化学的に不活性化されたり、生体内で代謝活性される際にその代謝酵素の活性が阻害され、あるいは代謝産物の活性が阻害され、失われたりして不活性化される場合がある。さらには、第2級アミンと亜硝酸との反応で抗変異原が生成する場合のように、亜硝酸が消費されてN-ニトロソ化反応が阻害されたり、反応によって生成したニトロソ化合物（特にニトロソアミド型化合物）の化学変化が促進され、結果として変異が抑制される場合などのあることが知られている。又、変異原物質が、細胞内DNAに作用した後、変異が固定されるまでの過程で働き、DNAの修復、複製機構を介した抗変異活性を示す場合もある。この機構には、傷害を受けたDNAの除去修復の促進、SOS反応 [Oda, Y., Nakamura, S., Oki, I., Kato, T., Shinagawa, H.: Mutation Res., 147, 219-229 (1985)] 修復の抑制など様々な現象がからむものと思われる。一方、老化に伴う病気としては癌を始め、動脈硬化や本性高血圧、パーキンソン氏病、アルツハイマー型痴呆、免疫不全等の難病が知られている。多くの生物は酸素がなくては生きてゆけない。一般に酸素には、動物に必須の酸素（三重項酸素分子： 3O_2 ）と、特定の条件あるいは体の不調時に生ずるラジカル（活性酸素）とが存在する。ラジカルは直接又は間接的（過酸化反応という形で）に細胞膜、細胞内顆粒膜、あるいはDNAをはじめ種々の細胞成分を変質、損傷させたりする。このラジカルは体内で生成され、その種類はスーパー-オキシドアニオン（ $^{\cdot}O_2^-$ ）、一重項酸素（ 1O_2 ）、水酸化ラジカル（ $\cdot OH$ ）等が存在する。このうちスーパー-オキシドアニオン（ $^{\cdot}O_2^-$ ）は細胞膜の不飽和脂肪酸などに作用して過酸化反応を引き起こし、脂質に対する酸化力は動物に必須な酸素の数千倍も多いといわれている。スーパー-オキシドジムスター-ゼ（SOD；酵素番号 EC 1. 15. 1. 1）は、1

10

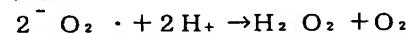
20

30

40

50

969年にマックコルド等 [McCord, J. M. & Fridovich, I.: J. Biol. Chem., 244, 6049 (1969)] によってその作用が発見された酵素であり、酸素分子が一電子還元されて生ずるスーパー-オキシドアニオン（ $^{\cdot}O_2^-$ ）を不均化する



を触媒する。人体が正常な時には、SODが働いてスーパー-オキシドアニオンの発生を抑えている。このSOD活性は加齢と共に低下し、すなわち壮年期から老年期になると活性が低下し、SOD活性の増減は生体の老化、癌化のパローメーターとも言われている。このようなSOD活性が低下するとラジカルの発生は抑えにくくなりSODを摂取補強するか、又はラジカルを捕捉除去するSOD様活性物質を有する物質を摂取することが必要となってくる。このような背景のもとに、抗癌、老化防止に対する特効薬がない今日、環境中から変異原／発癌因子を取り除いたり不活性化する抗変異原剤、並びに活性酸素フリーラジカル消去作用を示すスーパー-オキシドジムスター-ゼ（SOD）様活性食材に関する研究や検討が進められている。しかしながら、多くの抗変異原剤並びにSOD様活性食材は、それ自体生体に有害であったり嗜好性の面で常時飲用に不適当であるため実用化が困難である。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 前記従来技術において、ヒトが毎日飲用又は肌に塗布しても無害で、環境中に存在する変異原物質に対して広範囲の活性を有する抗変異原剤の開発は早急に望まれているものである。又、前記従来技術において、スーパー-オキシドジムスター-ゼ（SOD）はその製造が困難であり、また原料の入手も制限があり、ビタミンE、ビタミンCは生体を用いた実験では活性酸素フリーラジカル消去の作用が十分でない等の難点があり、更に強力な作用を有する活性酸素フリーラジカル消去作用を持つSOD様活性食材が要望されている。更に、変異原物質を取り除いたりする抗変異原剤、並びに活性酸素フリーラジカルを強力に消去するSOD様活性食材の多くは、その殆どが化学合成で製造されたものであり、またたとえ植物や動物からの材料を用いた天然物由来のものであっても、その製造過程で人体に害を及ぼす化学物質を用いたり、生成物の一部を化学物質と反応させて作られた物が多い。一方、茶は古くより保健と延命の妙薬として知られている。茶又は茶の抽出物を含め、茶の成分を分画して得られる茶カテキン類に多くの薬理効果がみられるることは衆知の事実である。そこで、本発明者は、天然物由来の安全生の高い茶葉を原料として、人体に危険な化学薬品を用いることなく、単に水あるいはアルコールで抽出した茶カテキン類を用いて、その in vitro (試験管内) における薬理作用について鋭意研究を重ねた結果、茶カテキン類が優

れた抗変異原活性並びにスーパーオキシドジムスターぜ様活性を有することを見い出した。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明は、上記知見に基づいてなされたものであって、茶カテキン類を有効成分として含有することを特徴とする抗変異原剤並びにスーパーオキシドジムスターぜ様活性食材である。以下、本発明につき詳細に説明する。

【0005】茶カテキン類は、ツバキ科の常緑低木 *Thespesia* L. の葉を水あるいは人体に無害なアルコールもしくはこれらの混合溶液で抽出する。これらは生の葉部を使用してもよく、また葉部を乾燥に用いてもよく、さらに葉部を発酵させあるいは発酵せることなく蒸成し、揉捻、乾燥を行ったものを用いてよい。このようなものとして緑茶、煎茶、はうじ茶、ウーロン茶、紅茶等がある。そして、茶カテキン類は (+) カテキン (C), (-) エピカテキン (EC), (-) エピガロカテキン (EGC)、(-) エピカテキンガレート (ECg) 及び (-) エピガロカテキンガレート (EGCg) が好適である。これらの物質は公知である。更に、上記各種茶カテキン類の他、遊離型テアフラビン、テアフラビンモノガレートA、テアフラビンモノガレートB、テアフラビンジガレート等の茶アフラビン類をも抗変異原剤並びにスーパーオキシドジムスターぜ様活性食材として使用することができる。本発明における茶カテキン類の抗変異原活性並びにスーパーオキシドジムスターぜ様活性については、第44回 日本栄養食糧学会総会（開催会場：川崎医療福祉大学、岡山）講演演題2D-4p 「大豆蛋白質由来低分子ペプチドのumu法によるTrp-P-1, IQに対する変異原抑制作用について」の方法に準拠して行うことができる。以下に本発明を実施例として具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0006】

【実施例1】乾燥した茶葉100重量部に対し、溶媒3.00～6.00重量部を加えて行う。溶媒としては、水、温湯、熱湯あるいはエタノールもしくはその含水物が用いられ、乾燥した茶葉を前記溶媒に浸漬するかあるいは加熱下で2分間～12時間抽出を行うことが望ましい。得られた抽出液は抽出溶剤除去して濃縮する。濃縮は前記抽出液を茶抽出成分が35wt%程度になるまで濃縮する。なお乾燥した茶100重量部は生葉約600重量部に相当する。また、アルコール抽出液の場合、濃縮する前後に、活性炭、酸性白土あるいは硅藻土等を用いて不要な成分を吸着、除去し、濃縮液を脱色してもよい。さらに、濃縮液を蒸発乾固したりあるいは凍結乾燥し粉末としてもよい。特に抽出液を活性炭で処理し、凍結乾燥を行うと得られる製品の保存中の変色を防止することができる。得られた茶カテキン類の濃縮液または粉末が本発明では抗変異原剤並びにスーパーオキシドジム

スターぜ (SOD) 様活性食材として用いられる。これらはそのまま用いてもよく、あるいはこれらをドリンク剤、錠剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤等の形として経口的に投与される。これらの剤の製造は、茶カテキン類濃縮液あるいは粉末に増量剤、バインダー、崩壊剤、着色剤、香料等をその製剤の剤型に応じて加えて、従来知られている慣用の製剤の製造法を用いて製造するとよい。投与量は、成人に対し粉末の場合1日約800mg～1,200mgを、また濃縮液の場合は2～8gを一日数回に分けて投与する。この投与量は、通常茶を飲用するときの数倍に相当する。この茶カテキン類は常用されている茶葉の成分であるので毒性はなく、従って上記投与量を越えて投与しても何等支障はない。このようにすると、癌や老化予防することができるばかりでなく、その治療にも有用である。また、得られた茶カテキンの固体を清水に溶かして、食品とともに摂取すると、癌の予防や老化制御に有用である。なお茶カテキン類 ((+) C, (-) EC, (-) EGC, (-) ECg, (-) EGCg) の組成を高速液体クロマトグラフィーにより調べた。野村化学製デベロシルODS-5カラム (φ4.5×15cm) を用い、移動相としてはアセトニトリル：酢酸エチル：0.05%リン酸水=1.2:2:8.6を用いた。流速1.0ml/min, カラム温度25°Cとし、検出波長280nmで行った結果を図1に示す。

【0007】

【実施例2】変異原試験の主流として現在用いられているエームス法や癌原性試験の結果とよく相関しているウムーテスト (umu-Test) を用いた。DNAへの損傷により誘発される一連の遺伝子群 (SOS遺伝子) のうち突然変異に直接関与しているumu-遺伝子の発現をβ-ガラクトシダーゼ活性 (Millerの方法, 1972年) を指標として測定した。活性型Trp-P-1 (3-アミノ-1, 4-ジメチル-5Hピリド [4, 3-b] インドール) (和光純薬製) によりSOSに反応を誘発する場合には、96穴マイクロタイタープレートの各ウェルにTGA培地 (1%トリプトン, 0.5%塩化ナトリウム, 0.2%グルコース, 0.01%アンピシリン) 中に10%のS-9mixを含むネズミチフス菌TA1535/psk1002株培養の菌液100μlに活性型Trp-P-1を10μl (濃度369, 184.5, 92.3, 46.1, 23.1, 11.5, 5.8μM) 加え、被検試料としての茶カテキン類 ((+) C, (-) EC, (-) EGC, (-) ECg, (-) EGCg) を10μl (濃度5μg) 加え、37°C 2時間反応させた。また、活性型IQ (2-アミノ-3-メチルイミダゾ [4, 5-f] キノリン) (和光純薬製) によりSOSに反応を誘発する場合には、96穴マイクロタイタープレートの各ウェルに、TGA培地中に10%のS-9mixを含むネズミ

チフス菌液 $100\mu\text{l}$ に活性型IQを $10\mu\text{l}$ （濃度5.04, 5.25, 2.3, 1.26, 1, 6.3, 1, 3.1, 5, 1.5, 8, 7, 9 μM ）加え、被検試料としての茶カテキン類（（+）C, （-）EC, （-）EGC, （-）ECg, （-）EGCg）を $10\mu\text{l}$ （濃度 $5\mu\text{g}$ ）加えた。反応液の β ガラクトシターゼ活性は各ウェルに基質濃度 $4\text{mg}/\text{ml}$ の2-ニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノシド $100\mu\text{l}$ を加え 37°C , 2時間酵素反応を行なわせ、1M炭酸ナトリウム $100\mu\text{l}$ を加え反応を停止した後、タイタープレート分光光度計（バイオラッド社製）で吸光度 620nm を測定した。変異原剤Trp-P-1に対する茶カテキン類の抗変異原活性測定の結果を2図に、また、変異原剤IQに対する茶カテキン類の抗変異原活性測定の結果を3図に示す。結果から、茶カテキン類の中でエピガロカテキンガレート（（-）EGCg）, エピカテキンガレート（（-）ECg）及びエピガロカテキン（（-）EGC）は、変異原剤Trp-P-1並びにIQに対して極めて強い抗変異原活性を有する。

【0008】

【実施例3】ウミホタルルシフェリン誘導体（CLA）は $^{\cdot}\text{O}_2$ ・、 $^{\cdot}\text{O}_2$ ・を特異的に検出する有効な化学発酵試薬であり、発明者ら（Agric. Biol. Chem., 55巻, 157-160頁, 1991年）の方法によりスーパーオキシドジムスターーゼ（SOD）を消*

カテキン類	分子量	$k_3 (\times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1})$
(+)-C	290.3	0.73
(-)-EC	290.3	0.62
(-)-EGC	274.3	3.1
(-)-ECg	414.4	9.6
(-)-EGCg	458.4	16.2

結果から、茶カテキン類の中で、エピガロカテキンガレート（（-）EGCg）、エピカテキンガレート（（-）ECg）及びエピガロカテキン（（-）EGC）は、極めて強い活性酸素フリー・ラジカル消去作用を有する。図4は、測定試料を加えない場合の化学発光の強度変化（積分）を示し、図5は、測定試料を加えた場合の化学発光の強度変化（積分）を示す。

* 光剤に用いた消光実験よりCLAと $^{\cdot}\text{O}_2$ ・との反応速度が求められる。ウミホタルルシフェリン誘導体CLA（ $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{ON}_3$ 、東京化成製、最終濃度 $1.39 \times 10^{-7} \sim 4.64 \times 10^{-8} \text{ M}$ ）溶液 $10\mu\text{l}$ 、アルブミン（50mg/50ml, シグマ化学製）500 μl 、キサンチンオキシターゼ（1.45unit/ml, シグマ化学製）50 μl を順に円筒型石英セル（内径 $14\text{mm} \times$ 高さ 60mm ）に入れ、ルミノーメーターAloka BLR-102B型（浜松ホトニクス製）の試料室内に移し、3mMヒポキサンチン溶液 $200\mu\text{l}$ を注入して、セル底面から化学発光を单一光量子計数により測定した。消光剤が存在する場合並びに存在しない場合の $^{\cdot}\text{O}_2$ ・の発光強度の比率 (I_0/I) は $I_0/I = 1 + [k_3 / (k_1 + k_2 [CLA])] \times [Q]$ で表わされる。ここで、[Q]はSOD様活性物質を、 k_1 は $^{\cdot}\text{O}_2$ ・の消失速度定数、 k_2 は $^{\cdot}\text{O}_2$ ・と[CLA]との反応速度定数、 k_3 は $^{\cdot}\text{O}_2$ ・と[Q]との反応速度定数を示す。本発明に係わる、茶カテキン類のスーパー・オキシドジムスターーゼ活性（反応速度定数 k_3 で表す）は表1のとおりである。

20 【0009】

【表1】茶カテキン類の活性酸素フリー・ラジカル消去作用

【0010】

【発明の効果】本発明は、茶葉から水またはアルコールを抽出溶媒として抽出した茶カテキン類を有効成分とする抗変異原剤並びにスーパー・オキシドジムスターーゼ様活性食材を提供するものである。本発明の抗変異原剤並びにスーパー・オキシドジムスターーゼ様活性食材は、癌の予防並びに老化制御に有効であり、生体にとって安全である。したがって本発明の抗変異原剤並びにスーパー・オキ

シドジムスター様活性食材は単に強力な抗変異原剤並びにスーパーオキシドジムスター様活性食材として医療分野で使用されるにとどまらず、食品、化学薬品類等の利用も期待できるものである。

【0011】

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明に係わる、茶葉を水、アルコールまたはこれらの混合溶液を抽出溶媒として抽出した茶カテキン類の高速液体クロマトグラフを示す。

【図2】本発明に係わる、変異原剤Trp-P-1各濃度に対する茶カテキン類 (+) C, (-) EC, (-) EGC, (-) ECg, (-) EGCg の抗変異原活性を示す。

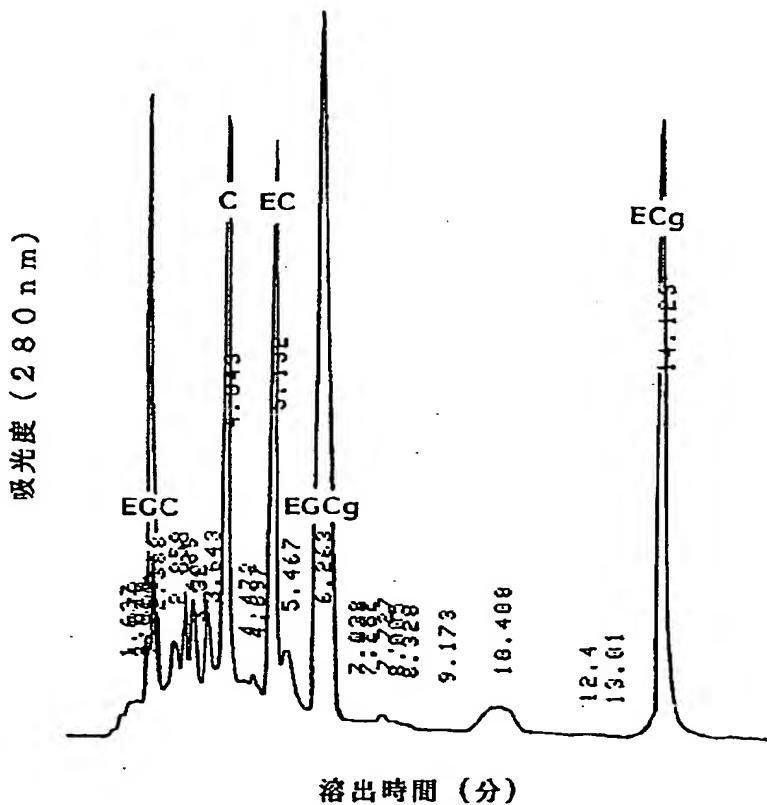
* 異原活性を示す。

【図3】本発明に係わる、変異原剤IQ各濃度に対する茶カテキン類 (+) C, (-) EC, (-) EGC, (-) ECg, (-) EGCg の抗変異原活性を示す。

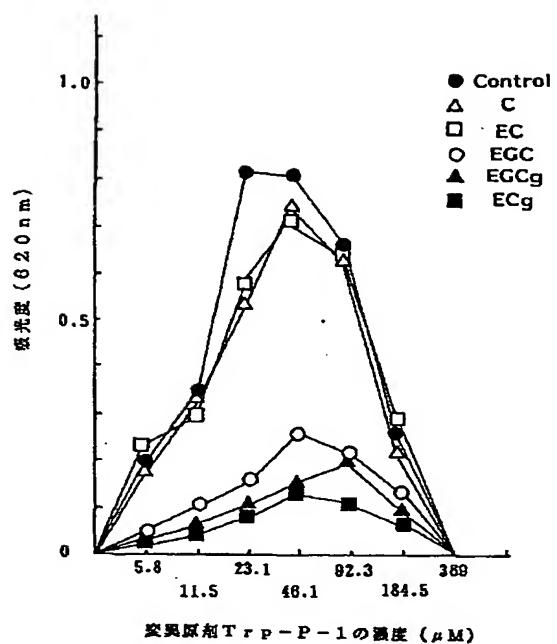
【図4】本発明に係わる、スーパーオキシドジムスター様活性測定の際、測定試料を加えない場合の化学発光の強度変化（積分）を示す。

【図5】本発明に係わる、スーパーオキシドジムスター様活性測定の際、測定試料を加えた場合の化学発光の強度変化（積分）を示す。

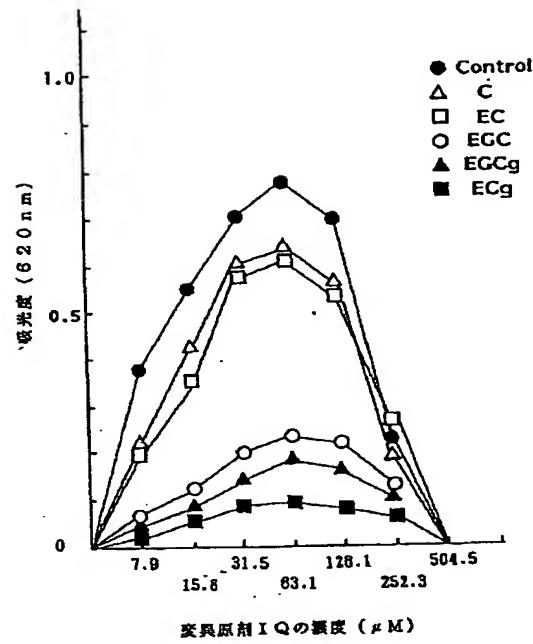
【図1】



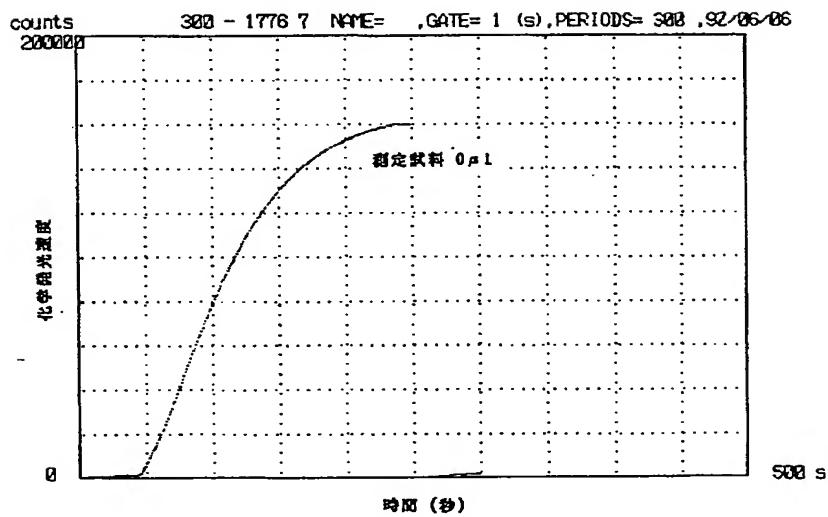
【図2】



【図3】



【図4】



【図5】

